

LES CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES SENSIBILITE AUX VIRUS

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE VIROLOGIE
DE L'HÔPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DES GENETTES
(Chef du Laboratoire : Médecin Lieutenant-Colonel MAÎTRE)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Juin 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Michel TSCHUPP

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 12 Mars 1939, à SARREBOURG (Moselle)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gaillon, 42

1964

LES CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES SENSIBILITE AUX VIRUS

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE VIROLOGIE

DE L'HÔPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

(Chef du Laboratoire : Médecin Lieutenant-Colonel MAÎTRE)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Juin 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Michel TSCHUPP

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 12 Mars 1939, à SARREBOURG (Moselle)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1964

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires	M. J. LEPINE, Membre de l'Institut. M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut.
Doyen	M. J.-F. CIER.
Assesseurs	MM. M. LEVRAT et L. REVOL.

Professeurs Honoraires : MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

Clinique urologique	MM. CIBERT.	Clinique / traumatologique des membres	MM. CREYSEL.
Physique biologique	PONTHUS (dét. à Beyruth).	Clinique carcinologique ..	DARGENT.
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME.	Anatomie pathologique ..	GUICHARD.
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON.	Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul.
Clinique chirurgicale B ..	WERTHEIMER.	Anatomie	LATARJET.
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT.	Pathologie chirurgicale ..	PEYCELON.
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT.	Thérapeutique	GIRARD Marcel.
Clinique médicale C	CROIZAT.	Pathologie médicale	VACHON.
Chimie biologique et médicale	ENSELME.	Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY.
Clinique chirurgicale A ..	MALLET-GUY.	Radiologie	PAPILLON.
Pharmacie galénique	REVOL.	Clinique des maladies infectieuses	JEUNE.
Clinique gynécologique ..	POLLOSSON.	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	GONIN.
Clinique obstétricale	PIGEAUD.	Bactériologie	MONNET.
Médecine du travail	BOURRET.	Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON.
Clinique médicale A	LEVRAT.	Physiologie B	CHATONNET.
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER.	Clinique endocrinologique.	GUINET.
Botanique et cryptogamie.	NETIEN.	Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT.
Clinique chirurgicale C ..	BERTRAND.	Clinique stomatologique ..	FREIDEL.
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND.	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles ..	MARION Joseph.
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON.	Matière médicale et législation pharmaceutique ..	DORCHE.
Médecine légale et déontologie	ROCHE.	Histologie et embryologie.	DUMONT Louis.
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT.	Chimie	PERROT.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phoniologie	MOUNIER-KUHN.	Physiologie A	CIER J.-F.
Clinique ophtalmologique ..	PAUFIQUE.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.	PERRIN J.
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS.	Clinique de chirurgie cardiaque	MICHAUD Pierre.
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN.	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	X...
		Biologie médicale et pharmacodynamie	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER.
Bactériologie	BERTOYE.
Neuro-chirurgie	MANSUY.
Chimie pharmaceutique	COLLET.
Clinique de pédiatrie	SARROUY.
Climatologie	LACROIX.
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS.
Neuro-chirurgie	LECUIRE.
Médecine générale	REVOL.
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD.

PROFESSEURS SANS CHAÎRE

Parasitologie	MM. ROMAN.
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André
Anatomie pathologique	FEROLDI,
Physique biologique	MORET.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGREGÉS TITULAIRES

Chimie biologique	MM. CREYSEL Roger	Electro-radiologie	MM. BUFFARD.
Hygiène	THIVOLET.	Médecine générale et thé-	
Parasitologie	GARIN.	rapeutique	LEJEUNE.
Electro-radiologie	PINET.	Stomatologie	de MOURGUES
Botanique et cryptogamie	ODDOUX.		F
Chimie analytique	de SOLLIERS.	Maladies infectieuses	NAUSSAC.
Médecine du travail	TOLOT.	Chirurgie générale	REBOUILLAT.
Médecine générale	DESPIERRES.	Pédiatrie	ROMAGNY.
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT.	Médecine générale	DELAHAYE J.P.
Chirurgie générale	DESCOTES.	Anesthésiologie	DELEUZE R.
Pathologie expérimentale	JOUVET.	Electroradiologie diagnostic	
Physique biologique	PEYRIN.	et thérapeutique	GIRAUD M.
Anatomie pathologique	TOMMASI.	Anesthésiologie	MICHEL.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGREGÉS STAGIAIRES

Anatomie	MM. DUROUX.	Biologie médicale et phar-	
Thérapeutique	BRETTE.	macodynamie	MM. FAUCON.
Anatomie	BOUCHET.	Physiologie	FLANDROIS.
Hématologie	FAVRE-GILLY.	Bactériologie	VIALIER-
Histologie et embryologie	GIRON.		RAYNARD.
Chimie biologique	GRAS.	Médecine générale	FRIES.
Chimie analytique	MALLEIN.	Médecine générale	LAMBERT.
Hygiène	RIFFAT.	Chirurgie générale	MICHOULIER.
		Pédiatrie	GILLY.

AGREGÉS EN EXERCICE

Obstétrique	MM. BURTHIAULT.	Chirurgie générale	MM. FRANCILLON
Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS.	Chirurgie générale	SAUBIER.
Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX.	Neuro-psychiatrie	SCHOTT.
Chirurgie générale	GUILLEMIN.	Neuro-chirurgie	ALLEGRE.
Chirurgie générale	JAUBERT-	Electro-radiologie	CHASSARD.
	DE-BEAUJEU.	Orthopédie	FAYSSÉ.
Chirurgie générale	MARION Pierre.	Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD.
Médecine générale	PLAUCHU.	Médecine générale	GARDE.
Médecine générale	PONT.	Ophtalmologie	HUGONNIER.
Chirurgie générale	SAUTOT.	Pneumo-phtisiologie	KALB.
Médecine générale	TRAEGER.	Médecine générale	LARBRE.
Médecine générale	VIGNON.	Chirurgie générale	MARET.
Ophtalmologie	BONAMOUR.	Médecine générale	MORNEX.
Médecine légale	COLIN.	Médecine générale	NORMAND.
Dermatologie	COLOMB.	Médecine générale	PERRIN André
Chirurgie générale	de MOURGUES	Pédiatrie et puériculture	BETHENOD.
	Georges.	Stomatologie	DUMAS.
Médecine générale	DEVIC.	Obstétrique	GARMIER.
Obstétrique	DUMONT	Médecine générale	NOEL.
	Martial.	Médecine générale	ROBERT.
Urologie	DURAND.	Orthopédie	SCHNEPP.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Président : M. BERTOYE; *Assesseurs* : MM. A. CIER,
FEROLDI et ROBERT.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MA FEMME

En témoignage de mon amour.

A MON FILS OLIVIER

A MES PARENTS

Ceux qui furent mes premiers maîtres.

A MES BEAUX-PARENTS

En témoignage de mon attachement
le plus affectueux.

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur A. BERTOYE

Professeur de Bactériologie

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon

Avec notre respectueuse gratitude pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de cette Thèse.

Nous lui exprimons notre très vive reconnaissance pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profond respect.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. CIER

Professeur de Pharmacie Chimique et Pharmacologie

Monsieur le Professeur FEROLDI

Professeur d'Anatomie pathologique

Monsieur le Professeur Agrégé ROBERT

Agrégé de Médecine

Nous les remercions de l'intérêt
qu'ils ont porté à notre travail en
acceptant de le juger.

A Monsieur le Médecin Lieutenant-Colonel P. MAITRE

*Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Chef du Laboratoire de Bactériologie
et Médecin-Chef du Service des Contagieux
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

Il a inspiré ce travail. Nous l'en remercions.

Nous garderons toujours le souvenir des trois années passées dans son Laboratoire et de l'enseignement qu'il nous a prodigué.

Pour ce que nous lui devons, qu'il nous soit permis de lui exprimer notre respect et notre profonde gratitude.

A Monsieur le Médecin Général-Inspecteur BORON

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A Monsieur le Médecin Colonel CAMELIN

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire*

A NOS MAITRES
DES HOPITAUX CIVILS ET MILITAIRES
ET DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON

A Monsieur le Médecin Commandant BONNET
Spécialiste des Hôpitaux Militaires

Nous avons pu bénéficier de sa grande expérience clinique, durant un semestre passé dans le Service des Contagieux.

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Médecin Capitaine PAYEN
Assistant des Hôpitaux Militaires

A Monsieur le Médecin Capitaine FAVIER
Assistant des Hôpitaux Militaires

Nous les remercions de l'aide qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de ce travail et les assurons de notre respectueuse gratitude.

A Messieurs les Médecins Capitaines
LABOUREL ET DOUCHET
Assistants des Hôpitaux Militaires

A MES CAMARADES DE PROMOTION

Le Médecin Lieutenant R. SIREIX

Le Médecin Lieutenant G. SANTUCCI

et tout particulièrement

Le Médecin Lieutenant J. GIANNUZZI

Notre amitié a permis de surmonter les difficultés rencontrées au cours de notre travail d'équipe.

Nous avons connu les mêmes joies, les mêmes soucis, les mêmes espérances pendant six années de vie commune.

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE DE VIROLOGIE
DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION
DESGENETTES

Nous remercions Mme ETTZEVE de sa collaboration. Elle a participé à notre initiation aux techniques de cultures cellulaires. Son aide nous fut précieuse durant trois ans.

Nos remerciements s'adressent aussi à Mlle DERONE qui a effectué les réactions sérologiques mentionnées dans ce travail.

INTRODUCTION

L'étude de six souches de cellules diploïdes humaines embryonnaires au Laboratoire de Virologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes ne peut être qu'un travail d'équipe et de longue haleine.

Dans sa thèse inaugurale, notre camarade, le Docteur J. Giannuzzi, retrace l'histoire de ces six souches.

Pour notre part nous avons été chargés d'apprécier la valeur de ce système cellulaire pour l'isolement des virus. Ce travail effectué sous la direction de Messieurs les Médecins Capitaines Favier et Payen, ne représente qu'un essai préliminaire qui nous a permis toutefois de nous familiariser avec les techniques courantes de Virologie et d'en connaître en particulier tous les écueils.

Nous rappellerons tout d'abord les données fournies par la Littérature au sujet des possibilités offertes par les cellules diploïdes humaines pour l'isolement et la culture des virus. Nous constaterons que les renseignements sont encore en nombre très réduit.

Nous exposerons ensuite les modalités de notre expérimentation ainsi que les résultats obtenus jusqu'ici.

Il ne nous a pas été possible en un an d'approfondir tous les problèmes. Il appartiendra à d'autres de reprendre toutes ces données afin de les compléter.

PREMIERE PARTIE

DONNEES FOURNIES PAR LA LITTERATURE

CHAPITRE PREMIER

LES CELLULES DIPLOIDES HUMAINES

Dans sa thèse inaugurale, notre camarade, le Docteur J. Giannuzzi, expose en détail les caractères des souches des cellules diploïdes (6). Nous nous bornerons à rappeler brièvement la définition et les principaux traits de ce nouveau système cellulaire.

Jusqu'en 1962, les Laboratoires de virologie disposaient de deux grands types de cultures cellulaires :

- Les cellules de première explantation,
- Les lignées cellulaires.

Chacun de ces systèmes possède ses avantages et ses inconvénients mais aucun ne représente le système idéal à usage universel.

Un nouveau système cellulaire a été proposé en 1962 par Hayflick et Moorhead. Il s'agit des cellules diploïdes humaines. Les « souches » de cellules diploïdes se distinguent des « lignées » cellulaires et des « cellules de première explantation » par un certain nombre de caractères.

— Comme les lignées cellulaires, les souches de cellules diploïdes peuvent faire l'objet de subcultures en série mais contrairement aux lignées qui sont pratiquement immortelles, les souches ont une vie limitée.

— Comme les cellules de première explantation, les cellules diploïdes ont une morphologie et un caryotype normaux qui demeurent stables au fil des passages. Contrairement aux cellules de première explantation dont

les subcultures aboutissent rapidement à l'arrêt de la culture ou à la transformation en lignée, les cellules diploïdes peuvent être repiquées en série pendant au moins six mois.

I. Caractères des souches diploïdes humaines

A. MORPHOLOGIE DES CELLULES.

La couche monocellulaire observée au microscope au faible grossissement apparaît formée de cellules allongées, fusiformes, transparentes à noyau peu visible. Les éléments sont orientés en alignements parallèles ou en faisceaux tourbillonnants (Planche I, fig. 1).

Après coloration d'une culture sur lamelle, la cellule a la morphologie d'un fibroblaste. Le cytoplasme est légèrement acidophile, le noyau est régulier, arrondi ou ovulaire ; la chromatine est finement réticulée, on note la présence de 1 à 4 nucléoles.

B. NAISSANCE, VIE ET MORT D'UNE SOUCHE DE CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES.

L'existence d'une souche de cellules diploïdes humaines est limitée. Elle s'étale sur environ six mois, sous réserve de réaliser des subcultures deux fois par semaine et selon le mode 2/1 (12).

Hayflick et Moorhead distinguent trois phases dans la vie d'une souche de fibroblastes diploïdes :

Phase I.

Cette phase concerne strictement la primoculture.

Phase II.

Elle débute avec la première subculture et se caractérise essentiellement par deux phénomènes :

— une activité métabolique intense ainsi qu'en témoigne l'acidification rapide du milieu de culture ;

— une activité mitotique extraordinaire qui, lors des subcultures, permet la reconstitution de la couche monocellulaire en trois à quatre jours.

Phase III.

Cette phase marque le déclin de la souche et annonce la mort de la culture. Elle se caractérise par une diminution de l'activité mitotique et l'apparition de débris dans la phase liquide. Cette évolution vers la mort est un phénomène inéluctable.

La perte de la culture survient après un nombre de subcultures qui est remarquablement fixe pour toutes les souches : elle se situe vers la cinquantième génération (50 ± 10). Aucun facteur capable d'empêcher ce phénomène n'a pu être trouvé et la plupart des hypothèses proposées pour en rendre compte n'ont pas reçu confirmation.

C. CARYOTYPE DES SOUCHES CELLULAIRES DIPLOÏDES HUMAINES.

L'étude des lots chromosomiques qui doit, pour être valable, intéresser un nombre important de cellules en métaphase, montre que ces cellules sont à la fois diploïdes et euploïdes :

- diploïdes, c'est-à-dire que le nombre de chromosomes est de $2n$ soit 46 ;
- euploïdes, c'est-à-dire que les chromosomes sont appariés par paires identiques.

De plus, l'analyse qualitative soignée montre qu'il n'existe aucune altération morphologique des chromosomes par rapport aux cellules normales (rupture, allongement, raccourcissement, etc...).

II. Avantages des souches cellulaires diploïdes humaines par rapport aux autres systèmes cellulaires.

A. MATÉRIEL DESTINÉ A LA MISE EN CULTURE. TECHNIQUE DE CULTURE. RENDEMENT.

Pour établir une souche de cellules diploïdes on utilise habituellement des tissus fœtaux.

Le milieu de culture est le classique milieu de Eagle BM 1955 ; les techniques de culture et subculture sont celles habituellement mises en œuvre en cultures cellulaires.

Le rendement de ce système est excellent puisque le nombre de flacons obtenus à partir d'un flacon de primoculture croît en progression géométrique de raison deux.

La résistance des cellules à basse température permet de conserver indéfiniment les souches et de repartir à volonté de tel ou tel passage.

Sur ce plan les souches cellulaires diploïdes humaines présentent donc un net avantage sur les cellules de première explantation et se placent au point de vue rendement à un niveau proche de celui des lignées cellulaires.

B. LA POPULATION CELLULAIRE EST HOMOGÈNE.

Elle présente les caractères morphologiques et caryotypiques des cellules humaines normales. Elles sont dénuées de tout pouvoir oncogène. Contrairement aux cellules des lignées cellulaires l'inoculation à l'homme ou dans la poche jugale du hamster ne détermine la production d'aucune tumeur maligne.

Sous cet angle leurs avantages par rapport aux lignées cellulaires sont évidents.

C. Les souches cellulaires diploïdes humaines ne sont pas parasitées par des virus latents; qu'il s'agisse de simples virus perturbant l'observation des cultures ou de virus oncogènes d'origine simienne..

D. Enfin, les cellules diploïdes d'origine humaine seraient très sensibles à la majorité des virus pathogènes pour l'homme. Les titres infectieux obtenus seraient aussi élevés que sur les systèmes cellulaires habituellement utilisés.

L'ensemble de ces avantages font que les souches cellulaires diploïdes humaines constituent un système cellulaire idéal pour l'isolement, la culture des virus et la préparation de vaccins.

CHAPITRE DEUXIEME

SENSIBILITE DES CELLULES DIPLOIDES HUMAINES AUX VIRUS

En matière de culture de virus, la valeur d'un système cellulaire est affirmée en faisant appel à deux critères :

1. L'effet cytopathogène, c'est-à-dire la destruction des cellules par le virus.

2. La quantité de virus produite dans ces cultures.

Le premier de ces caractères est essentiel lorsqu'on envisage d'utiliser un système cellulaire aux fins d'isolement de virus ou encore de titrage de virus et d'épreuve de neutralisation. En effet, c'est le critère qui doit permettre d'exprimer d'une façon objective et univoque le fait que le virus s'est ou ne s'est pas multiplié. Il est ainsi possible de déterminer :

- Dans le cas d'un isolement, si le virus est présent ou non ;
- Dans le cas d'un titrage, jusqu'à quelle dilution le virus est encore présent.

Le second critère (quantité de virus produite) peut être totalement indépendant du premier. Dans certains cas, en effet, il peut s'établir une infection dite « chronique », c'est-à-dire que la culture produit du virus, parfois de titre relativement élevé, sans que des lésions puissent être observées sur les lames colorées.

Il n'est donc pas absolument nécessaire que l'effet cytopathogène soit présent pour que les cultures cellulaires soient utilisables en virologie.

C'est dans cette double optique que différents auteurs ont envisagé d'étudier la sensibilité aux virus des cellules diploïdes humaines. On doit noter cependant que :

1. L'expérimentation a surtout été réalisée avec des souches de virus isolées et entretenues sur des systèmes divers de culture de virus ;

2. Les résultats acquis jusqu'ici sont encore fragmentaires sauf peut-être en ce qui concerne les virus poliomyélitiques.

La sensibilité à un grand nombre de virus est une propriété des cellules diploïdes humaines sur laquelle Hayflick et Moorhead ont longuement insisté (12). Ces auteurs considèrent que ce système cellulaire offre en conséquence de larges perspectives non seulement dans le domaine de l'isolement des virus, mais encore dans celui de la culture des virus en vue de la préparation des vaccins.

Hayflick et Moorhead mentionnent que plus de cent virus pathogènes pour l'homme ont pu être cultivés sur cellules diploïdes humaines. C'est ainsi par exemple que les virus poliomyélitiques cultivent aisément, quel que soit le type sérologique auquel ils appartiennent, en produisant un effet cytopathogène. De même la culture de nombreux entérovirus est possible. Les auteurs citent en particulier le cas de certains virus Cocksackie A : les types A 9 et A 13 sont cytopathogènes alors que le type A 1 ne l'est pas. De même le virus Cocksackie B 1 pourrait également se multiplier sans entraîner de modifications de la nappe cellulaire mais d'autres estiment que la propagation des cinq virus Cocksackie B est impossible sur ce système cellulaire (14).

En revanche, la possibilité de cultiver et d'isoler tous les virus ECHO avec observation de lésions cellulaires est admise universellement.

Les avantages qu'offrent les cellules diploïdes humaines dans la culture des entérovirus sont donc indéniables. Toutefois le résultat de certaines études aboutit à la notion que le titre des virus cultivés sur cellules diploïdes humaines est inférieur à celui que l'on obtient sur d'autres systèmes cellulaires et plus particulièrement en culture de cellules épithéliales de rein de singe.

Pour les virus poliomyélitiques, par exemple, les titres seraient supérieurs de 1 log 10 lorsqu'on utilise les cellules simiennes. Néanmoins après quelques passages sur cellules diploïdes humaines les titres obtenus dans les deux systèmes cellulaires sont comparables. Dans une étude conduite avec les souches de virus poliomyélitiques atténuées de Sabin, ce résultat a été obtenu après quatre passages pour les types I et II et après neuf passages pour le type III.

Tous les myxovirus peuvent être cultivés sur cellules diploïdes humaines. La multiplication de certains d'entre eux s'accompagne d'un effet cytopathogène (virus grippal A2 et B, virus parainfluenzae 3). D'autres n'ont aucune action apparente sur la couche monocellulaire mais peuvent être titrés grâce aux réactions d'hémagglutination et surtout d'hémadsorption (grippe C, virus parainfluenzae 1 et 2).

Les titres de virus obtenus sont toujours nettement inférieurs à ceux que l'on réalise dans les cultures effectuées sur cellules de rein de singe. Une exception est à faire : Le virus parainfluenzae 3 donne des titres plus élevés en culture de fibroblastes humains.

Hayflick et Moorhead (12) signalent que les adénovirus peuvent être cultivés sur les fibroblastes diploïdes humains. D'autres auteurs précisent que les titres infectieux obtenus sont variables selon les types sérologiques. Rosanoff obtient avec le type 7 des titres aussi élevés que 10^{10} . D'une façon générale les titres de virus se montrent plus élevés sur cellules diploïdes que sur cellules épithéliales de rein de singe. Cette particularité devient encore plus nette avec

les agents du Common Cold. Mais nous reviendrons sur ce point dans la deuxième partie de ce travail.

Bien d'autres virus ont été ainsi étudiés dans le but de déterminer si leur culture dans ce système cellulaire pourrait être utilisée pour la préparation des vaccins. Ainsi en va-t-il des virus de la Vaccine, de la Rage, de la Rougeole. Mais il ne s'agit encore que de travaux préliminaires.

En France la sensibilité des cellules diploïdes humaines a particulièrement été recherchée dans le cas des virus ARBOR d'une part et celui des agents du Trachôme et de la conjonctivite à inclusions d'autre part.

En ce qui concerne les ARBOvirus, l'étude a été conduite par Hannoun en utilisant simultanément plusieurs souches de fibroblastes diploïdes humains. Parmi celles-ci figurait la souche Lyon I. Les résultats obtenus peuvent être résumés de la façon suivante (11).

1. ARBOvirus du groupe A de CASALS

Les virus Chikungunya et Wee se sont révélés très pathogènes pour les cellules diploïdes humaines ; ils provoquent dès le premier passage un effet cytopathogène rapide et brutal avec un titre infectieux de l'ordre de 10^{-5} .

2. ARBOvirus du groupe B de CASALS

a) *Fièvre jaune.*

Les essais ont été effectués avec plusieurs souches de virus dont la souche 17 D Rockefeller. Le virus cultive aisément avec effet cytopathogène complet en six jours. Par ailleurs les titres obtenus sont suffisants pour que l'on puisse espérer grâce à quelques améliorations utiliser ces cultures pour la préparation de vaccins. Toutefois l'isolement du virus de la fièvre jaune sur ce système cellulaire demeure hypothétique.

b) *Autres virus du groupe B.*

Outre le virus de la fièvre jaune, les virus West-Nile, encéphalite d'Europe centrale et dengue ont été étudiés. Au premier passage, ces virus n'ont pas donné d'effet cytopathogène et cependant ils s'étaient multipliés ainsi qu'en témoignaient les titres moyens obtenus. Il semble qu'après quelques passages on puisse à la fois faire apparaître un effet cytopathogène et augmenter les titres.

c) *ARBOvirus du groupe Bunyamwera.*

La souche type Bunyamwera provoque un effet cytopathogène dès le premier passage, effet qui devient plus rapide après quelques passages tandis que le titre du liquide surnageant atteint $10^{-5}/0,03$ ml.

Dans ces essais, la souche Lyon I a montré une sensibilité équivalente à celle des autres souches de cellules diploïdes, en particulier des souches du Wistar Institute.

Quant aux agents du trachôme et de la conjonctivite à inclusions, leur culture a été réalisée par Lassalle sur notre souche de cellules Lyon I (18). Les constatations suivantes ont été faites : pour la première fois une souche de trachôme (SA 2) et de conjonctivite à inclusions (LB 1) ont pu être cultivées avec production d'un effet cytopathogène reproductible en série. La cytolyse des cellules intervient avec la libération dans le milieu nutritif de corps élémentaires infectieux. Cette observation permet entre autres applications d'entrevoir la possibilité de titrage de ces agents par les techniques de dilution ou de plaque ainsi que la réalisation d'épreuves de neutralisation.

Telles sont les données que fournit la Littérature au sujet de la sensibilité aux virus des cellules diploïdes humaines. Deux faits sont à souligner :

1. Le caractère partiel des résultats obtenus jusqu'ici.

2. L'orientation bien définie des études vers la culture de souches virales connues et déjà utilisées pour la fabrication de vaccin.

Le problème pour un Laboratoire de Virologie clinique est de déterminer si les cellules diploïdes manifestent une grande sensibilité aux souches sauvages de virus lors de leur isolement.

Notre camarade, le Docteur J. Giannuzzi, a exposé dans son travail l'histoire encore partielle de six souches de cellules diploïdes humaines établies au Laboratoire de Virologie de l'H.M.I. Desgenettes. Nous nous proposons de rapporter les observations que nous avons effectuées en utilisant ces six souches pour cultiver certains virus.

- soit virus sauvages lors de tentatives d'isolement à partir de prélèvements pathologiques ;
- soit virus déjà adaptés à d'autres systèmes cellulaires.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE PREMIER

MATERIELS ET TECHNIQUES

Les essais que nous avons effectués ont été classés sous trois rubriques :

- Tentatives d'isolement des virus sur cellules diploïdes humaines ;
- Tentatives d'adaptation sur cellules diploïdes humaines de virus de collection ;
- Cultures de virus déjà adaptés aux cellules diploïdes humaines.

I. Tentatives d'isolement de virus sur cellules diploïdes humaines

A. ISOLEMENT DES VIRUS DU GROUPE VARICELLE - ZONA - HERPES.

1. LES MALADES.

a) *Varicelle* :

Neuf tentatives ont été effectuées chez des malades hospitalisés dans le Service des Contagieux de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes. Dans sept cas le prélèvement a été réalisé dans les 48 heures qui ont suivi le début de la maladie. Dans deux cas, les malades ont été vus de façon plus tardive, quatre jours après le début de l'éruption.

b) *Zona* :

Les malades, au nombre de deux, ont été admis à l'hôpital au premier jour de leur affection.

c) *Herpès* :

Dans ce cas encore, deux malades ont fait l'objet de prélèvement, respectivement 24 et 48 heures après l'apparition des signes cliniques.

2. TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT.

Dans les trois éventualités précédentes, la technique employée a été la même. Après désinfection de la région à l'éther, le liquide de plusieurs vésicules a été aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur très effilée, puis rejetés dans un tube contenant environ 1 ml de milieu de Eagle. Le prélèvement a toujours été exploité dans les quinze minutes qui ont suivi sa réalisation. Dans un cas, une partie du liquide a été congelée et conservée à -20°C . (Varicelle).

3. PRIMOCULTURE DES VIRUS.

a) *Plusieurs souches de cellules ont été inoculées* :

- Quatre souches dérivées de muscle : Lyon 1, 2, 3, 5 ;
- Une souche établie à partir de tissu pulmonaire : Lyon 4.

Ces cultures de cellules ont été utilisées à des moments divers de leur existence : avant la dixième génération, entre les dixièmes et vingtièmes générations, entre les vingtièmes et trentièmes générations.

Les cultures étaient réalisées dans des flacons plats de 60 ml ayant une paroi mesurant 28 cm^2 et contenant 7 ml de milieu.

b) *Technique d'inoculation.*

La technique d'inoculation a été la suivante :

- Elimination du milieu nutritif ;
- Remplacement par du milieu de Eagle additionné de 3 % de sérum de veau et contenant des antibiotiques aux concentrations habituelles ;
- Addition de 0,25 ml de prélèvement ;
- Incubation à 37°C.

Au cours des jours suivants, l'observation a été réalisée par l'examen microscopique au faible grossissement de la couche monocellulaire.

4. SUBCULTURES DES VIRUS.

Les flacons dans lesquels se manifestait un effet cytopathogène ont fait l'objet de subcultures en utilisant deux sortes d'inoculat :

a) Phase liquide des cultures centrifugées à 0°C, à une vitesse de trois mille tours par minute pendant quinze minutes.

b) Phase liquide des cultures contenant soit des lambeaux de la couche monocellulaire détachés par râclage à l'aide d'une pipette Pasteur, soit encore la totalité de la population cellulaire dispersée par une solution de trypsine à 0,25 gm % dans du liquide de Hanks, puis remis en suspension dans 10 ml de milieu de Eagle additionné de 3 % de sérum de veau. Au moment de l'inoculation, cette préparation est diluée au dixième avec du milieu de Eagle.

Ces deux variétés d'inoculats ont étéensemencées :

- dans des flacons identiques à ceux utilisés lors des primocultures des virus ; chaque flacon recevait 0,25 ml d'inoculat ;

— dans des tubes à lamelle type Leyghton contenant 2 ml de milieu ; l'inoculat était alors de 0,10 ml.

Les lamelles ont ultérieurement fait l'objet de deux séries d'investigations :

- Etude des lésions cellulaires après coloration à l'hématéine-éosine ;
- Epreuve d'immunofluorescence selon les méthodes qui seront indiquées plus loin.

5. IDENTIFICATION DES VIRUS ISOLÉS.

L'identification a été conduite de la façon suivante :

- a) Etude des caractères cultureux.
- b) Etude des lésions cytologiques sur lamelles colorées à l'hématéine-éosine ;
- c) Identification sérologique réalisée à l'aide de sérums tests introduits avec les virus isolés dans des réactions de fixation du complément.
- d) Identification par la technique d'immunofluorescence (5). Les gammaglobulines employées dans la méthode directe ont été préparées et marquées au Laboratoire (3) ; Pour la méthode indirecte, nous avons fait appel à des préparations commercialisées de gammaglobulines antihumaines marquées.

6. CONSERVATION DES VIRUS.

- a) *Virus Varicelle-zona.*

— Liquide de vésicule.

L'un de nos prélèvements a été conservé au réfrigérateur à -20°C après avoir été dilué dans du milieu de Eagle contenant 3 % de sérum de veau.

— Cultures de Virus.

Les essais de conservation ont été faits sur plusieurs variétés de préparations :

— Conservation à -20°C de lambeaux de la couche monocellulaire obtenus par râclage à l'aide d'une pipette Pasteur et mis en suspension dans du milieu de Eagle supplémenté avec 3 % de sérum de veau.

— Conservation à -70°C de suspensions identiques à la précédente.

— Conservation à -196°C (azote liquide) de préparations obtenues en employant la technique suivante : lorsque la couche monocellulaire présente des lésions atteignant environ le tiers de sa surface, les cellules sont trypanées et mises en suspension dans du milieu de Eagle contenant 10 % de sérum de veau, 10 % de glycérine stérile. La suspension est ajustée à 2.10^6 cellules par ml puis répartie en ampoules à raison de 1 ml par ampoule. Après un séjour minimum de 3 heures à $+4^{\circ}\text{C}$, les ampoules sont congelées de façon progressive jusqu'à -70°C ; elles sont ensuite plongées dans l'azote liquide. Il s'agit en somme de la technique de conservation des cellules à basse température décrite par notre camarade Giannuzzi, dans sa thèse inaugurale (6, 26).

7. ETUDE COMPARÉE DE L'ÉVOLUTION DES ANTICORPS CHEZ LES MALADES ATTEINTS DE VARICELLE ET DE ZONA.

A. Les Sérums.

Pour chaque malade, des échantillons de sérum ont été préparés à partir du sang prélevé aux premier, quatrième, huitième, douzième et dix-huitième jours après le début de la maladie.

Nous avons utilisé :

12 collections de sérums de malades atteints de Varicelle ;

7 collections de sérums de sujets présentant un Zona.

B. *Les Antigènes.*

Deux variétés de préparations antigéniques ont été réalisées et introduites dans les réactions afin de comparer leur valeur respective.

Antigène n° 1.

Il s'agit de la phase liquide des cultures recueillies dix à quinze jours après l'inoculation de la couche monocellulaire.

Antigène n° 2.

On utilise des flacons inoculés dont les lésions ont évolué pendant cinq à huit jours ; les cellules sont détachées par râclage à l'aide d'un rubber policeman et mises en suspension dans la phase liquide de la culture.

La préparation est soumise à un microbroyage de trois minutes dans un appareil de Durel et Sausse puis centrifugée pendant quinze minutes à une vitesse de trois mille tours minute. Le liquide surnageant représente l'antigène. Les antigènes ont été titrés par la méthode classique de Boerner et Luckens.

C. *Réactions.*

1. RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT.

Seule a été pratiquée la réaction de fixation du complément par la microméthode (28). Les volumes ont été mesurés avec une pipette donnant cinquante gouttes par ml. Les deux variantes de la réaction ont été mises en œuvre :

a) technique à chaud, adaptation en microméthode de la technique de Hoyle (13) ;

Sérum à expertiser	1 goutte
Antigène 2 unités dans une goutte	1 goutte
Complément 2 unités dans une goutte	1 goutte
Sérum physiologique	1 goutte
Fixation au bain marie à 37°C pendant 1 heure.	
Hématies sensibilisées à 4 Unités	2 gouttes

Lecture après trente minutes au bain-marie à 37°C.

b) technique à froid, adaptation en microméthode de la technique de Kolmer :

Sérum à expertiser 1 goutte

Antigène 2 unités dans une goutte 1 goutte

Complément 2 unités dans 2 gouttes 2 gouttes

Fixation du complément au réfrigérateur à + 4°C pendant 18 heures.

Hématies sensibilisées à 2 unités 2 gouttes

Lecture après trente minutes au bain-marie à 37°C.

Est considérée comme positive toute réaction de fixation du complément entraînant l'absence totale d'hémolyse ou ne présentant que 0 à 25 % au maximum d'hémolyse, soit ++++ ou +++.

2. RÉACTION DE PRÉCIPITATION.

La technique utilisée a été celle décrite par Outcherlony (20).

B. TENTATIVE D'ISOLEMENT DU VIRUS DE L'HEPATITE.

1. LES MALADES.

Nous avons effectué douze tentatives d'isolement chez des malades hospitalisés dans le Service des Contagieux de l'H.M.I. Desgenettes :

- Deux ont été admis dans le Service à la phase préictérique ;
- Dix ont été hospitalisés dans les 48 heures qui ont suivi l'apparition de l'ictère.

2 LES PRÉLÈVEMENTS.

Seuls ont été utilisés les sérums de ces malades.

3. TECHNIQUES UTILISÉES.

a) *Systèmes de culture de cellules.*

Il s'agit de nos souches de fibroblastes humains. Nous avons essayé simultanément quatre souches dérivées de muscle et une souche établie à partir de tissu pulmonaire.

Les cellules étaient cultivées comme dans les essais précédents, en flacons plats de 60 ml ayant une paroi mesurant 28 cm² et contenant 7 ml de milieu.

b) *Inoculat.*

Le sérum des malades a été introduit dans les flacons en quantités variables (0,25 à 1 ml) après avoir été chauffé au bain-marie à 60°C pendant 60 minutes (29).

c) *Observation des cultures.*

Les flacons ensemencés, incubés à 37°C, ont été examinés chaque jour pendant un mois. Chaque semaine on procédait à un changement de milieu et à une subculture sur souches de fibroblastes humains. Chaque subculture a elle-même fait l'objet de trois subcultures à une semaine d'intervalle.

Le milieu de survie utilisé était du milieu de Eagle contenant 3 % de sérum de veau.

C. TENTATIVE D'ISOLEMENT D'ADENOVIRUS.

1. LES MALADES.

Neuf tentatives d'isolement ont été effectuées à l'occasion d'une épidémie d'adénoviroses ayant évolué pendant l'hiver 1963-1964 dans les camps militaires d'entraînement de la région lyonnaise.

2. LES PRÉLÈVEMENTS.

a) Deux malades ont fait l'objet de prélèvements de selles ; ceux-ci ont été traités par la méthode classique de l'extraction à l'eau.

b) Des lavages de gorge ont été réalisés chez trois malades à l'aide de liquide de Hanks ; ces prélèvements additionnés d'antibiotiques ont été simplement centrifugés à froid à une vitesse de trois mille tours minute pendant trente minutes.

3. LES SYSTÈMES CELLULAIRES.

Les cultures cellulaires étaient réalisées dans des flacons plats de 60 ml dont les caractéristiques ont déjà été données.

Nous avons mis en œuvre :

- Des cellules KB ;
- Des cellules rénales embryonnaires humaines de première explantation ;
- Des souches de fibroblastes humains diploïdes à différentes générations :
souches Lyon 1, 2, 3, 5 (d'origine musculaire) ;
Lyon 4 (d'origine pulmonaire).

Les systèmes cellulaires qui ont présenté des altérations cellulaires (cellules KB et cellules rénales embryonnaires humaines) ont fait l'objet de subcultures en séries dès l'apparition des lésions.

Les souches de cellules diploïdes (qui n'ont présenté aucune altération) ont été observées en adoptant la même conduite que lors des tentatives d'isolement du virus de l'hépatite :

- Observation quotidienne pendant un mois ;
- Changement de milieu chaque semaine ;
- Subculture hebdomadaire.

D. TENTATIVES D'ISOLEMENT DE RHINOVIRUS.

1. LES MALADES.

Nous n'avons retenu, lors de ces tentatives, que cinq malades présentant les symptômes classiques du Common Cold.

2. LES PRÉLÈVEMENTS.

Ils ont été réalisés suivant le protocole décrit par Ham-parian (8). On procède à un écouvillonnage soigneux du pharynx en utilisant deux cotons montés sur tige de bois ; ces deux écouvillons sont longuement lavés dans 5 ml de milieu de Eagle. Après addition de pénicilline et de streptomycine, les liquides sont centrifugés à froid à deux mille tours minute pendant trente minutes. L'inoculat est représenté par le liquide surnageant.

3. LES SYSTÈMES CELLULAIRES.

Les cellules étaient cultivées dans des flacons de 60 ml dont les autres caractéristiques ont déjà été fournies.

Les systèmes cellulaires suivants ont été utilisés pour chaque prélèvement :

- Deux flacons de cellules KB ;
- Deux flacons de cellules rénales embryonnaires humaines de première explantation ;
- Deux flacons de cellules Lyon 1, 2, 3 et 5 ;
- Deux flacons de cellules Lyon 4.

Le milieu de survie était du milieu de Eagle additionné de 3 % de sérum de veau et ne contenant que 0,09 gm % de bicarbonate de soude, le pH initial étant de 7,2 à 7,4.

4. INCUBATION ET OBSERVATION DES FLACONS.

Les flacons inoculés ont été répartis en deux lots identiques,

— l'un a été incubé à 37°C ;

— l'autre a été placé à l'étuve à 33°C sur un tambour tournant aménagé à cet effet.

L'observation quotidienne a été complétée par la réalisation de subcultures systématiques au bout d'une semaine.

II. Tentatives d'adaptation sur cellules diploïdes humaines de virus de collection

A. VIRUS DE LA VACCINE

Nous avons utilisé une ampoule de vaccin lyophilisé.

L'inoculat était représenté par 0,20 ml d'une dilution à 10^3 de virus reconstitué. Les flacons de 60 mlensemencés ont été ensuite incubés à 37°C. Une épreuve d'Hémadsorption a été effectuée au bout de 24 heures en faisant appel à des hématies de poulet (34).

B. VIRUS GRIPPAUX

Des tentatives d'adaptation de virus grippaux aux fibroblastes humains ont été réalisées en utilisant deux souches de virus A et A2. Ces virus primitivement isolés et cultivés sur œufs embryonnés ont été ensuite adaptés aux cellules rénales de veau de première explantation. La souche A a ainsi subi 18 passages en culture de cellules épithéliales ; la souche A2 adaptée à ce système cellulaire par nous-même a été l'objet de douze subcultures. L'une et l'autre souche provoque sur les cellules épithéliales de rein de veau un effet cytopathogène caractéristique qui a été décrit ailleurs (4, 23).

Ces virus adaptés aux cellules ont été inoculés dans des cultures de nos différentes souches. (Lyon 1 à 5) avec des inoculats de concentrations variées.

Les flacons ensemencés incubés à 37°C ont été observés pendant un mois. A chaque changement de milieu, on procédait à :

- une épreuve d'hémadsorption à l'aide d'hématies 0 humaines ;
- une épreuve d'hémagglutination sur le liquide de culture.

III. Culture de virus déjà adaptés aux cellules diploïdes humaines

L'essai a consisté à cultiver la souche de virus H.G.P. Ce virus (1), lorsqu'il nous a été remis, avait été l'objet de cultures suivantes :

MK 3, MK 2, KB 4, W1 38/2

La culture du virus a été faite sur toutes nos souches de fibroblastes humains réparties soit en flacons soit en tubes à lamelle afin d'étudier l'effet cytopathogène.

(1) Nous remercions de son obligeance M. le Docteur LANG (Institut français de la fièvre aphteuse).

CHAPITRE II

RESULTATS

I. Tentatives d'isolement de virus sur cellules diploïdes humaines

A. ISOLEMENT DES VIRUS

DU GROUPE VARICELLE-ZONA-HERPES.

Il convient de mentionner d'emblée que les résultats obtenus sont strictement identiques pour les virus isolés chez des malades présentant soit une varicelle, soit un zona. Les constatations effectuées avec les virus isolés de cas d'herpès sont quelque peu différentes.

1. — VIRUS VARICELLE-ZONA

A. - Résultats des tentatives d'isolement :

— Malades atteints de Varicelle : Les sept tentatives effectuées avant le 4^e jour de la maladie ont toutes été couronnées de succès ; en revanche, les deux essais réalisés après le 4^e jour ont abouti à des échecs.

— Malades atteints de Zona : un virus a été isolé dans les deux cas.

B. - Valeur des systèmes cellulaires utilisés :

Les isolements ont été facilement réalisés, quelle que soit la souche cellulaire mise en jeu ; nous n'avons relevé

aucune différence de réceptivité entre les souches d'origine musculaire et celles issues de poumon. De même la sensibilité des cellules aux virus était identique, quelle que soit la génération cellulaire en cause.

C. — Etude de l'effet cytopathogène.

Les manifestations de l'activité virale ont été facilement mises en évidence à l'aide des méthodes classiques d'observation des cultures cellulaires.

a) Examen microscopique de la couche monocellulaire au faible grossissement.

En trois à quatre jours, alors que le pH du milieu n'accuse qu'une baisse identique à celle des cultures témoins, on note sur la surface de la couche monocellulaire, la présence de quelques foyers disséminés dont l'aspect est bien particulier. Ces foyers, de taille encore réduite, sont constitués par quelques cellules qui sont le siège des modifications suivantes : arrondissement des éléments avec accentuation du pourtour cytoplasmique ; dans le même temps, le noyau paraît augmenté de volume et devient plus réfringent. Ces amas de cellules modifiées semblent plaqués contre la couche monocellulaire qui conserve par ailleurs un aspect normal.

Dans les jours qui suivent, chacun des foyers tend à s'accroître par extension centrifuge, mais en épousant les courbes des faisceaux cellulaires où ils ont pris naissance, dessinant ainsi des aspects en croissant.

Au bout de huit à dix jours on assiste à la confluence de tous les foyers.

b) Examen microscopique des lamelles colorées à l'hémateïne-éosine.

L'examen des préparations au faible grossissement ne fait que confirmer l'existence des lésions qui viennent d'être décrites.

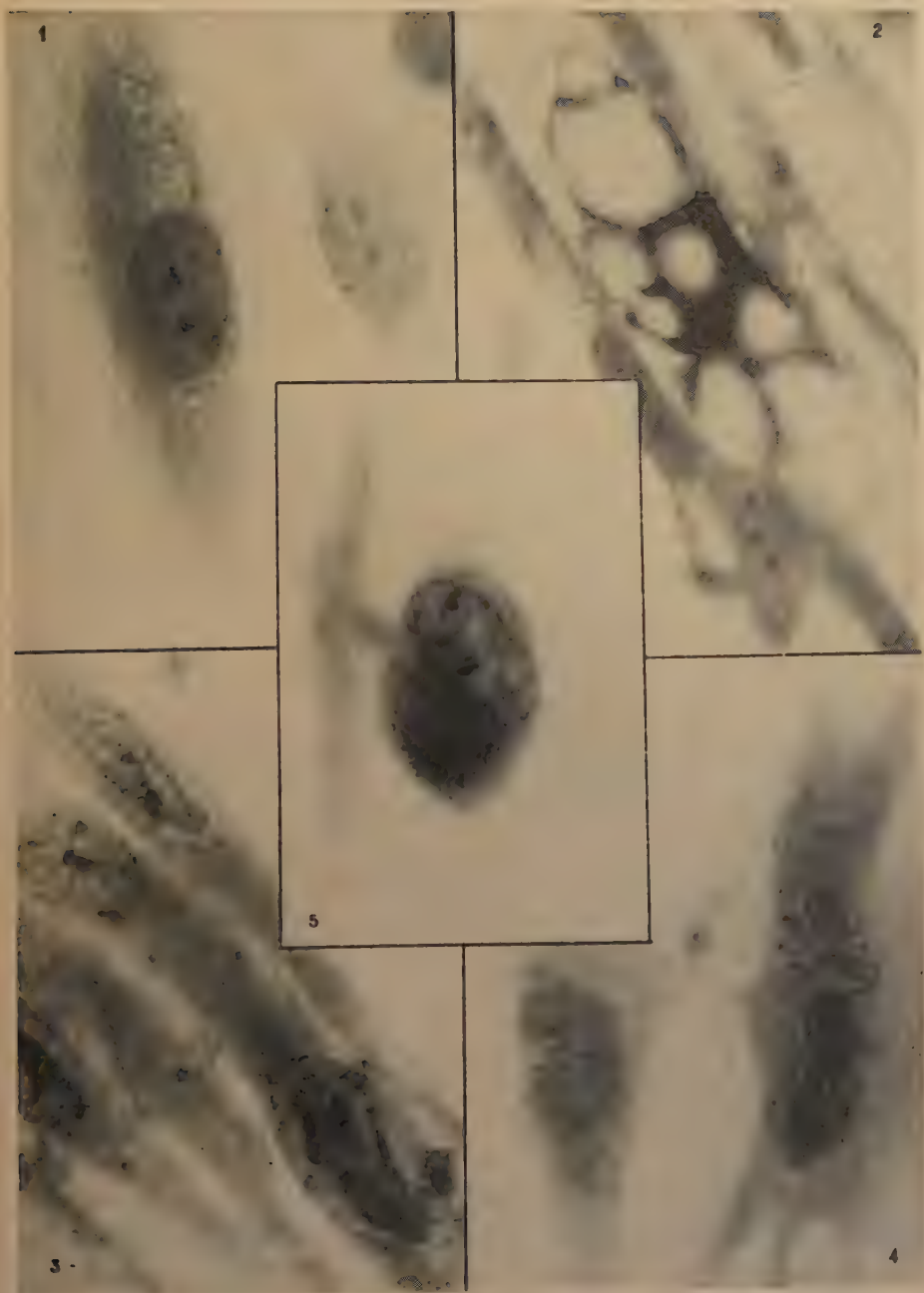


PLANCHE I

FIGURE 1 : Fibroblaste diploïde normal.

FIGURE 2 : Lésions provoquées par l'adénovirus type 7.

FIGURE 3 : Lésions cytopathogènes du virus de la varicelle.

FIGURE 4 : Lésions produites par le virus de l'herpès simplex.

FIGURE 5 : Lésions provoquées par un rhinovirus.

L'observation au fort grossissement permet une analyse plus détaillée des modifications des structures cellulaires.

Alors que le cytoplasme semble indemne de toute altération, le noyau, en revanche, est le siège de remaniements importants. L'analyse minutieuse d'un foyer permet de reconstituer le film retraçant l'évolution des lésions nucléaires : les nucléoles, en général au nombre de 2 à 4, disparaissent peu à peu par fragmentation ; le noyau tend par ailleurs à perdre sa basophilie habituelle, en raison de l'effacement progressif du réseau chromatinien. Dans le même temps apparaît une inclusion intranucléaire acidophile dont la taille s'accroît de façon régulière ; cette masse polylobée refoule vers la membrane du noyau les débris des structures nucléaires qui tendent finalement à dessiner un liseré basophile festonné délimitant ce qui fut le noyau. A ce stade, le cytoplasme est peu visible car il se trouve réduit à un mince anneau entourant le noyau remanié (Planche I, fig. 4). Dans un cas, nous avons vu apparaître, lors de la deuxième subculture, des cellules géantes multinucléées.

D. - Identification des virus isolés :

a) Réaction de fixation du complément.

Toutes les cultures de virus ont donné lieu à la préparation d'antigènes selon les techniques décrites au chapitre précédent.

Chacun de ces antigènes a été introduit dans des réactions de fixation du complément en face de sérums tests antivarielleux et antizona.

Les résultats ont été les suivants :

— Préparation antigénique constituée par la phase liquide des cultures recueillie dix à quinze jours après l'inoculation. Le pouvoir antigénique s'est montré pratiquement nul, sauf dans un cas ; il s'agissait de culture de virus varicelleux cultivé sur la souche Lyon 4.

-- Préparation antigénique constituée par la phase liquide des cultures contenant en suspension la couche monocellulaire détachée mécaniquement, puis soumise à un microbroyage. Avec cet antigène, toutes les réactions se sont montrées positives ; le titre du sérum test a été retrouvé que l'antigène soit constitué par du virus de la Varicelle ou par du virus du Zona.

b) Immunofluorescence.

Les lamelles de virus varicelleux ont été traitées à la fois par des sérums antivaricelle et antizona ; il en a été de même pour les lamelles de virus du Zona. Les constatations ont été strictement identiques dans chaque cas. La fluorescence est uniquement localisée à l'inclusion intranucléaire.

Une série de tubes a été ensemencée avec la même suspension virulente. Une lamelle était prélevée à intervalle régulier afin de suivre l'évolution du développement de la fluorescence. Nous avons pu constater que la fluorescence est déjà visible à la 36^e heure, localisée dans le nucléole. A ce stade, une lamelle colorée à l'hématéine-éosine montre que les nucléoles ne sont pas encore déformés. Ultérieurement, la fluorescence s'installe à l'intérieur même du noyau, revêtant les mêmes contours que les inclusions visibles sur les lamelles colorées à l'hématéine-éosine.

E. - *Subcultures des virus :*

Les résultats ont été variables selon la nature de l'inoculat.

1° Les subcultures n'ont pas été possibles avec le seul liquide surnageant des cellules centrifugées.

2° Les subcultures ont de même échoué avec un inoculat constitué par une suspension de cellules infectées soumises à un microbroyage.

3° Seules ont réussi les subcultures réalisées en introduisant des lambeaux de couche monocellulaire détachée mécaniquement, mais n'ayant subi aucun traitement ultérieur. Dans ces cas, on voit apparaître de nombreux foyers dans un délai de 24 à 48 heures. Des résultats identiques sont obtenus avec des cellules infectées décollées par trypsination.

F. - *Conservation des virus :*

a) Le liquide de vésicule

Le liquide de vésicule, après conservation de 2 mois à -20°C , a pu facilement permettre la culture du virus.

b) Culture du virus

— Les cellules obtenues par raclage, mises en suspension dans du milieu de Eagle contenant 3 % de sérum de veau et conservées à -20°C ont perdu toute activité après quelques jours de conservation.

— La même suspension conservée à -70°C a été inactivée au bout du même temps.

— En revanche, la conservation dans l'azote liquide de cultures cellulaires infectées trypsinées et mises en suspension dans du milieu de Eagle additionné de 10 % de sérum de veau et glycérimé à 10 %, s'est montrée d'une remarquable efficacité. Nous avons pu aisément remettre en culture un virus conservé dans ces conditions depuis huit mois.

G. - *Etude comparée de l'évolution des anticorps chez des malades atteints de Varicelle et de Zona :*

Les résultats des réactions de fixation du complément effectuées avec, comme antigène, un microbroyat de cellules infectées sont mentionnés dans les tableaux I et II.

TABLEAU I
MALADES ATTEINTS DE VARICELLE

Malade n°	Sérum prélevé n jours après le début de la maladie				
	1 ^{er}	4 ^e	8 ^e	12 ^e	18 ^e
1	0	—	—	—	1/256
2	0	—	1/32	1/64	1/128
3	0	—	1/64	1/64	1/128
4	0	—	1/16	1/128	1/128
5	0	—	1/16	1/128	1/128
6	0	—	—	1/128	1/128
7	0	—	1/16	1/128	1/256
8	0	—	—	—	1/256
9	0	—	—	—	1/128
10	0	—	—	—	1/128
11	0	—	—	—	1/128
12	0	—	—	—	1/64
13	0	—	—	—	1/128

TABLEAU II
MALADES ATTEINTS DE ZONA

Malade n°	Sérum prélevé n jours après le début de la maladie				
	1 ^{er}	4 ^e	8 ^e	12 ^e	18 ^e
1	—	—	1/128	1/256	—
2	—	—	1/256	1/556	—
3	0	1/64	1/256	1/512	—
4	0	1/256	1/512	1/512	1/512
5	0	—	1/1024	1/1024	1/1024
6	0	1/256	1/512	1/512	1/512
7	0	1/512	—	1/1024	—

2. ISOLEMENT DU VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX

A. *Résultats des tentatives d'isolement.*

Les deux tentatives ont été des succès.

B. *Valeur des systèmes cellulaires utilisés.*

Comme dans le cas des virus Varicelle-Zona, toutes les souches se sont montrées également sensibles quelle que soit la génération mise en jeu.

C. *Etude de l'effet cytopathogène.*

Les aspects réalisés par le virus de l'herpès simplex dans les cultures de fibroblastes diploïdes humains sont identiques à ceux qui ont été décrits à propos des virus Varicelle-Zona. Deux données toutefois sont différentes :

— L'atteinte de la couche monocellulaire a été chaque fois massive d'emblée.

— Et surtout les lésions ont évolué avec une très grande rapidité. Les cultures cellulaires ont été détruites dans les 48 heures qui ont suivi leur inoculation (Planche I fig 3).

D. *Identification du virus isolé.*

a) Réaction de fixation du complément.

Des antigènes ont été préparés selon les techniques décrites à propos du virus varicelle-zona. La préparation constituée par le liquide de culture recueilli une fois réalisée la destruction de la couche monocellulaire puis centrifugé, s'est montrée antigénique. En revanche la préparation constituée par le broyat des cultures, a montré une activité antigénique nulle.

L'identification du virus de l'herpès a été facilement réalisée à l'aide d'un sérum-test introduit dans une réaction de fixation du complément en face d'un antigène préparé à partir de la culture des cellules.

b) Immunofluorescence.

Cette technique ne nous a pas permis d'aboutir à des résultats valables. En effet l'évolution des lésions est tellement rapide qu'il devient difficile de distinguer entre la fluorescence spécifique et la fluorescence non spécifique que présente toute cellule nécrosée.

E. Subcultures du virus.

Les subcultures du virus ont toujours été possibles à l'aide de la seule phase liquide centrifugée de la culture. Le virus au 4^e passage sur la souche Lyon 4 à la 4^e génération, titrait $10^{-7,5}$ doses cytopathogènes 50 par ml.

F. Conservation du virus.

Le liquide surnageant recueilli après destruction de la couche monocellulaire et conservé à -20°C , montre une baisse considérable de son activité après 11 mois.

B. TENTATIVE D'ISOLEMENT DU VIRUS DE L'HEPATITE INFECTIEUSE.

Tous les essais que nous avons effectués ont été des échecs. Il n'a jamais été possible d'obtenir la moindre modification de la couche monocellulaire tant à l'occasion des primocultures que lors des subcultures aveugles.

C. TENTATIVES D'ISOLEMENT D'ADENOVIRUS.

Nous avons décrit au chapitre précédent les techniques utilisées pour effectuer ces tentatives ; Nous avons précisé en particulier que les prélèvements comprenaient 2 extraits de selles et 3 prélèvements pharyngés. Les systèmes cellulaires simultanément ensemencés étaient représentés par des cellules KB, des cellules rénales embryonnaires humaines et diverses souches de fibroblastes humains diploïdes.

a) Résultats des tentatives d'isolement.
Ils sont compris dans le tableau III.

TABLEAU III

N° du prélèvement	Système cellulaire			
	KB	Rein embryonnaire humain	LYON 4	LYON 5
1 (selles)	+	non utilisé	0	0
2 (selles)	+	non utilisé	0	0
3 (pharynx)	+	+	0	0
4 (pharynx)	+	+	0	0
5 (pharynx)	+	+	0	0

Toutes les subcultures aveugles réalisées sur fibroblastes humains sont demeurées négatives.

Les virus isolés sur cellules KB et sur cellules rénales embryonnaires humaines de première explantation appartenaient tous au type 7.

II. Tentatives d'adaption de certains virus aux cellules diploïdes humaines

A. ADENOVIRUS.

Nous avons relaté précédemment les échecs des tentatives d'isolement d'adénovirus sur cellules diploïdes humaines. L'adaptation de ces virus sur ce système cellulaire est toutefois possible ; les essais que nous avons effectués à ce sujet ont donné lieu aux observations suivantes : Une souche d'adénovirus type 7 isolée sur cellules rénales embryonnaires humaines de première explantation et ayant subi quatre passages sur ce système, a été inoculée sur la souche Lyon 4 à la vingtième génération, sur les souches Lyon 3 et Lyon 5 respectivement aux 17^e et 10^e générations

1. OBSERVATIONS EFFECTUÉES LORS DE LA PREMIÈRE CULTURE SUR FIBROBLASTES DIPLOÏDES HUMAINS.

a) *Examen microscopique de la couche monocellulaire.*

On observe, six jours après l'inoculation, des modifications discrètes de la couche monocellulaire. On aperçoit disséminés au sein de la culture de cellules, des éléments isolés dont le noyau est discrètement remanié alors que le cytoplasme et les contours cellulaires paraissent intacts. Les noyaux apparaissent plus volumineux que normalement et ont tendance à devenir plus réfringents.

Deux ou trois jours plus tard ces modifications apparaissent de façon plus évidente : le noyau est trois à quatre fois plus volumineux que dans les cellules environnantes ; sa structure interne est par ailleurs complètement remaniée : on distingue au fort grossissement une masse centrale très réfringente séparée du pourtour nucléaire par d'énormes vacuoles.

Au bout de quinze jours toutes les cellules sont pratiquement atteintes ; Les cellules les plus altérées commencent à se nécroser et à se détacher de la paroi du verre.

Dans le même temps, l'acidité du milieu se montre beaucoup plus prononcée que dans les flacons témoins.

b) *Examen des lamelles colorées à l'hématéine-éosine.*

Cet examen ne fait qu'objectiver de façon plus précise les constatations effectuées sur les cellules vivantes à l'examen microscopique au fort grossissement. Les lésions de début sont essentiellement caractérisées par l'augmentation de volume du noyau avec apparition d'inclusions basophiles disséminées dans ce dernier.

Puis apparaît une couronne de fines vacuoles optiquement vides bordant la face interne de la membrane nucléaire. Dans le même temps les inclusions basophiles augmentent de volume. Plus tard les vacuoles acquièrent une

taille considérable et refoulent vers le centre du noyau un matériel basophile rassemblé finalement en une masse volumineuse de contour irrégulier. Le noyau est alors monstrueusement hypertrophié (Planche I fig. 2).

2. OBSERVATIONS EFFECTUÉES LORS DES SUBCULTURES SUR DES FIBROBLASTES DIPLOÏDES HUMAINS.

Au fil des repiquages les délais d'apparition des lésions se trouvent progressivement raccourcis : c'est ainsi qu'au 7^e passage, les modifications nucléaires sont apparues au 2^e jour après l'inoculation ; pourtant la destruction totale des cellules n'a été acquise qu'en 10 jours. Le titre du virus (déterminé sur des cellules Lyon 4) atteignait à ce moment 10^3 doses cytopathogènes 50 par ml.

B. VIRUS GRIPPAL.

Toutes les tentatives effectuées pour adapter les souches A et A2 sur fibroblastes embryonnaires humains sont demeurées vaines.

Rappelons que les souches utilisées étaient adaptées aux cellules épithéliales de rein de veau où elles entraînent l'apparition de lésions cytoplasmiques caractéristiques, avec libération importante de virus infectieux dans la phase liquide ainsi qu'en témoignent les titres hémagglutinants d'une part et le pouvoir infectieux titré sur œuf d'autre part (10^{-6}).

Ces résultats n'ont pu être reproduits sur fibroblastes diploïdes humains. Nous n'avons constaté ni lésions cellulaires, ni hémagglutinines dans le milieu, ni hémadsorption des hématies humaines 0 sur la couche monocellulaire.

C. VIRUS VACCINAL.

L'adaptation du virus vaccinal aux fibroblastes diploïdes humains a été facilement réalisée.

1. PRIMO-ADAPTATION SUR FIBROBLASTES DIPLOÏDES HUMAINS.

a) Examen microscopique de la couche monocellulaire. Nous avons observé quatre jours après l'inoculation, l'apparition au sein de la couche monocellulaire, d'îlots de cellules arrondies, granuleuses et réfringentes. Dans les jours qui suivent ces îlots deviennent de plus en plus nombreux et font bientôt place à des plages claires bordées de cellules altérées. Ces plages de nécrose s'étendent et tendent à confluer, dissociant ainsi la nappe cellulaire. Enfin la couche cellulaire est complètement dissociée et il ne reste plus que des amas de cellules agglutinées en voie de lyse, amas qui se détachent de la paroi du flacon.

b) Examen des lamelles colorées à l'hématéine-éosine. Il permet la constatation d'inclusions éosinophiles intra-cytoplasmiques en général uniques, de structure plus ou moins homogène et de taille variable. Ces inclusions semblent correspondre aux corps de Guarniéri.

c) Epreuve d'Hémadsorption des Hématies de poulet. Elle s'est montrée positive au bout de 78 heures malgré l'absence de lésions cytopathogènes.

2. SUBCULTURES SUR FIBROBLASTES DIPLOÏDES HUMAINS.

Au cours de l'adaptation du virus vaccinal on observe que l'effet cytopathogène tend à devenir de plus en plus précoce et intense. Après quelques passages, le virus vaccinal donne des lésions importantes dès la 24^e heure. Les titres du virus n'ont pas été déterminés. L'épreuve d'Hémadsorption est positive au bout de 24 heures.

III. Culture de virus déjà adaptés aux cellules diploïdes humaines

Notre expérimentation est limitée à la souche H.G.P. de rhinovirus. Quatre jours après l'inoculation la couche mono-

cellulaire commence à se modifier : on voit apparaître disséminés à la surface de la nappe cellulaire, des petits foyers de cellules arrondies granuleux et réfringents. Puis le contour de ces éléments devient irrégulier. Plus tard, les cellules arrondies manifestent une tendance à la rétraction et se détachent de la paroi du verre. Les foyers se développent progressivement par extension centrifuge et la couche monocellulaire est totalement détruite en une douzaine de jours. L'examen de lamelles colorées à l'hématéine-éosine précise la nature de l'effet cytopathogène. La lésion débute au sein du cytoplasme par une inclusion éosinophile qui s'étend progressivement en même temps que la cellule s'arrondit. Cette inclusion refoule à un pôle de la cellule le noyau qui n'est le siège d'aucun remaniement mais prend un aspect réniforme. Au stade terminal cependant le noyau devient pycnotique. Cette lésion est analogue à celle observée avec les entérovirus.

L'effet cytopathogène se manifeste de façon beaucoup plus nette et présente une évolution plus rapide dans les flacons placés à 33°C en tambours tournants.

Mais nous n'avons relevé aucune différence entre les cultures de virus H.G.P. sur fibroblastes humains d'origine musculaire et celles réalisées sur fibroblastes dérivés de poumon. De même la sensibilité des cellules au virus a été identique quelle que soit la génération cellulaire en cause (Planche I, fig. 5).

CHAPITRE III

DISCUSSION

Nous ne nous étendrons pas sur les résultats négatifs de notre expérimentation. Celle-ci est encore trop réduite pour que l'on puisse en tirer des conclusions définitives. Le cas des adénovirus est toutefois à envisager à part. Les tentatives d'isolement ont été réalisées en nombre suffisant ainsi que sur différents systèmes cellulaires simultanément pour qu'il nous soit possible d'affirmer que l'adénovirus type 7 ne peut être isolé sur les cellules diploïdes humaines.

Nous commenterons donc avec plus de détails les résultats positifs que nous avons obtenus.

I. INTERET DES CELLULES DIPLOIDES HUMAINES POUR LE DIAGNOSTIC DES VIRUS DU GROUPE VARICELLE-ZONA-HERPES.

Les résultats que nous avons exposés en détail nous permettent d'aborder trois problèmes :

1. L'isolement de ces agents ;
2. La définition des caractères qui permettent l'identification rapide de ces virus dont l'effet cytopathogène est commun ;
3. Les aspects particuliers du groupe Varicelle-Zona.

I. ISOLEMENT DES VIRUS.

Les trois virus ont été facilement isolés et cultivés sur nos souches de cellules diploïdes humaines. On doit souligner en outre que toutes ces souches cellulaires ont montré la même sensibilité.

A. *Isolement du virus de l'herpès.*

L'isolement aisé du virus de l'herpès simplex n'est pas pour surprendre. Ce virus est en effet pathogène pour les trois grands systèmes de culture des virus.

1. C'est ainsi que le lapin présente des manifestations variables selon le point d'inoculation : éruption vésiculeuse typique du revêtement cutané ou kérato-conjonctivite suivie parfois d'encéphalite.

2. La membrane chorio-allantoïque de l'œuf embryonné se montre particulièrement sensible au virus de l'herpès. Les lésions caractéristiques y apparaissent en 1 à 2 jours et atteignent leur maximum en 3 à 4 jours. Elles sont essentiellement représentées par de petites plaques blanches surélevées dont le nombre est directement proportionnel à la concentration du virus contenu dans l'inoculat.

3. La culture de cellules enfin est très largement utilisée pour l'isolement et la culture du virus herpétique. Les résultats les meilleurs sont obtenus avec les cellules rénales de lapin mais tous les systèmes cellulaires connus peuvent être utilisés, qu'il s'agisse de lignées cellulaires (KB, Hela) ou de primocultures (cellules rénales de singe ou de mouton, fibroblastes de poulet).

Il était prévisible dans ces conditions que les fibroblastes diploïdes humains se montreraient eux aussi très sensibles au virus de l'herpès. De fait les deux tentatives d'isolement ont été des succès. La couche monocellulaire a été détruite en 48 heures. Les titres infectieux du liquide surnageant étaient élevés. Les subcultures du virus sont

opérées sans aucune difficulté en prenant comme inoculat la phase liquide des cultures.

Toutes les générations cellulaires se sont montrées d'une égale réceptivité. Les cellules diploïdes ne présentent donc pas l'inconvénient des primocultures âgées. On sait par exemple que les primocultures d'amnios humain produisent de moins en moins de plaques à mesure que la culture vieillit (19).

B. Isolement des virus du groupe Varicelle-Zona.

C'est également avec facilité que les virus de ce groupe ont été isolés. Or on sait qu'il s'agit là d'agents qui exigent, pour se multiplier, des conditions bien particulières. De fait leur culture est demeurée impossible pendant longtemps.

Les essais d'inoculation à l'animal ont presque toujours échoués. Un seul résultat positif a été rapporté par Rivers qui, après inoculation intratesticulaire de liquide de vésicule au singe vervet, a observé au point d'inoculation des lésions cellulaires caractérisées par la présence des inclusions intranucléaires décrites par Paschen en 1919 (24, 22). Ultérieurement la multiplication du virus avait pu être réalisée par ensemencement de fragments cutanés greffés sur la membrane chorio-allantoïque de l'œuf de poule incubé (1, 7).

La culture du virus de la varicelle est en fait contemporaine de l'utilisation en Virologie des cultures cellulaires. C'est en 1952, en effet, que Weller et Stoddard réussissent l'isolement dans des conditions satisfaisantes, en utilisant des cultures de cellules embryonnaires humaines (35). On a reconnu depuis que seules les primocultures réalisées à partir de tissu humain ou simien, permettaient d'obtenir ce résultat.

Nos résultats montrent que nos souches de fibroblastes diploïdes humains conviennent parfaitement pour l'isolement de ce virus à condition que deux impératifs soient respectés :

a) le prélèvement doit être effectué très tôt après le début de la maladie clinique : les deux échecs que nous avons connus concernaient deux prélèvements réalisés quatre jours après l'apparition des vésicules à un moment où les malades bien que couverts de lésions étaient devenus apyrétiques.

b) l'ensemencement doit être fait dans les délais les plus rapides. Rappelons que nous avons inoculé nos prélèvements dans le quart d'heure qui a suivi leur réalisation.

Les cellules diploïdes paraissent offrir au virus des conditions particulièrement favorables à son développement. En effet tous les auteurs signalent l'apparition des premières lésions cytopathogènes 7 à 19 jours après l'inoculation, plus rarement entre 5 et 11 jours. Dans notre expérimentation ces délais se sont montrés réduits de façon constante : en effet, les 7 isollements que nous avons réalisés, ont manifesté de façon indiscutable leur positivité 3 jours après l'inoculation. Il faut bien admettre dans ces conditions que la facilité de l'isolement du virus dans nos essais soit à rattacher à l'utilisation du système cellulaire particulier que représentent les cellules diploïdes humaines.

II. IDENTIFICATION DES VIRUS VARICELLE-ZONA-HERPÈS.

Nous avons longuement décrit au chapitre résultats, les lésions cytopathogènes observées lors de la culture des virus de ce groupe. Il est possible de se rendre aisément compte que les agents de l'herpès, du zona et de la varicelle sont générateurs de lésions cellulaires, qui sont apparemment identiques dans les trois cas. Certains phénomènes pourtant permettent de distinguer facilement le virus de l'herpès de ceux du groupe varicelle-zona.

A. Les conditions d'évolution de la culture cellulaire infectée sont nettement différentes dans l'un et l'autre cas. La rapidité de la progression des lésions au sein de la couche monocellulaire infectée par le virus de l'herpès

s'oppose à la lenteur de l'évolution des lésions provoquées par les virus Varicelle-Zona.

B. Les subcultures des virus permettent en outre de mettre en évidence une différence importante entre ces différents virus :

a) Dans le cas du virus herpétique les subcultures sont facilement réalisables en prenant comme inoculat un certain volume de la phase liquide de la culture ;

b) Dans le cas des virus Varicelle-Zona, une subculture ne peut être réalisée avec un tel inoculat. Le transfert des cellules infectées est obligatoire.

C. La sérologie montre enfin qu'il s'agit indiscutablement de virus ne présentant aucune parenté antigénique.

a) Réaction de fixation du complément.

On sait que le virus de la varicelle produit un antigène soluble (36, 38). Nous avons essayé de mettre en évidence cet antigène dans le liquide surnageant des cultures. Des résultats ont pu être obtenus dans un cas seulement ; encore les titres antigéniques se sont-ils montrés extrêmement faibles. De semblables constatations ont été faites par d'autres. Il semble que la production d'antigène soluble soit variable selon la souche de virus de la varicelle en cause.

Avec le virus de l'herpès le liquide surnageant ne manifeste aucun pouvoir antigénique et pourtant ce liquide se montre infectieux, parfois même à un taux très élevé. L'antigène demeure toujours intracellulaire.

b) Epreuve de neutralisation.

Elle est facilement réalisable dans le cas du virus herpétique puisque l'agent est libéré dans le milieu au moment de la lyse des cellules. Le titrage du virus n'offre aucune difficulté, qu'il s'agisse de la méthode classique en tubes ou de la technique des plages. Quant à l'épreuve de neutralisation elle peut être réalisée par la technique classique.

Avec les virus Varicelle-Zona il en va tout autrement.

— Le titrage du virus est difficile. On sait, en effet, que le virus demeure intracellulaire. Tous les essais tentés pour le libérer sont jusqu'ici demeurés sans résultats. Le microbroyage des cellules, les congélations suivies de décongélations sont des procédés habituellement utilisés dans ce but. Ils donnent lieu à des préparations dans lesquelles le virus n'est pas infectieux. L'obligation de réaliser un titrage avec des cellules infectées entache les résultats d'imprécisions.

— Aussi l'épreuve de neutralisation est-elle difficile et imprécise.

c) Immunofluorescence.

Elle permet un diagnostic aisé et précis. Mais il faut tenir compte d'un certain nombre de causes d'erreurs dues notamment aux fluorescences non spécifiques (nécrose cellulaire) où à la mauvaise qualité des gamma-globulines marquées. La possibilité d'artéfacts entraîne la nécessité d'introduire dans cette épreuve de nombreuses préparations témoins. L'identification précise de l'antigène grâce à l'immunofluorescence permet de déterminer la localisation de celui-ci au cours des phases de sa formation.

Mais sur ce point les résultats de nos observations ne coïncident pas avec ceux des autres auteurs.

Nous avons décrit l'évolution du développement de la fluorescence dans les cellules infectées par un virus Varicelle-Zona. La fluorescence apparaît tout d'abord dans le nucléole à la 36^e heure, envahit ensuite le noyau en se superposant aux aspects observés sur les lamelles colorées à l'hématéine-éosine. Ces constatations recoupent les observations effectuées en microscopie électronique (31) et qui permettent d'objectiver tout d'abord la présence de particules dans les mailles du nucléole, ensuite la formation autour de ces particules d'une première puis d'une deuxième membrane, celle-ci développée aux dépens de l'invagination de la membrane nucléaire.

Les résultats de nos observations en immunofluorescence diffèrent de ceux obtenus récemment par Rosanoff (27).

Cet auteur observe que la première manifestation de la fluorescence se situe dans le cytoplasme en périphérie du noyau. Le noyau ne devient fluorescent qu'après la 72^e heure.

Une expérimentation supplémentaire est donc rendue nécessaire pour vérifier ces résultats.

De ce qui précède il ressort qu'il est facile de distinguer virus de l'herpès et virus du groupe Varicelle-Zona. Mais il est impossible de trouver la moindre différence entre les virus de la varicelle et du Zona. L'étude sérologique à laquelle nous nous sommes livrés confirme les données fournies par la Littérature. Dans les tableaux I et II, en effet, nous avons consigné les résultats des réactions de fixation du complément effectuées sur des sérums de malades atteints respectivement de varicelle et de Zona. Il apparaît que chez ces derniers le taux des anticorps fixant le complément est déjà très élevé au 4^e jour de la maladie. Il faut dans les cas de varicelle attendre le 18^e jour pour obtenir des valeurs identiques.

Nous devons souligner en outre que différentes préparations antigéniques ont été utilisées, réalisées avec diverses souches de virus isolées à partir de ces mêmes malades. Nous n'avons jamais obtenu, comme certains (25), des titres d'anticorps plus élevés avec les sérums homologues.

Ainsi se trouve confirmée l'unicité des virus du groupe Varicelle-Zona et le fait que le Zona représente une forme récurrente de varicelle.

III. CONSERVATION DES VIRUS DU GROUPE VARICELLE-ZONA-HERPÈS.

La difficulté de conserver ces virus est bien connue. Certaines études ont montré que le virus de l'herpès pouvait conserver son pouvoir infectieux pendant plusieurs

mois à condition d'être conservé à -70°C dans un milieu contenant du lait écrémé. En ce qui concerne le virus varicelle-zona il existe un contraste frappant entre les comportements du virus in vivo et in vitro.

1. Le liquide des vésicules, en effet, contient un matériel infectieux abondant et dont la conservation est aisée :

— La présence de particules virales libres et infectieuses est attestée par la réalisation facile des isollements à partir du liquide des vésicules même, soumis à une centrifugation destinée à éliminer toute cellule qui aurait pu être détachée lors de la récolte du prélèvement.

— Le liquide de vésicules fournit un matériel de valeur pour toutes les réactions sérologiques, réaction de fixation du complément et réaction de précipitation.

— Les études au microscope électronique ont montré la présence de nombreuses particules virales libres de forme ovale mesurant de 150 à 200 m μ (31).

2. Le pouvoir infectieux du liquide des vésicules peut en outre être facilement conservé pendant de longues périodes. Il persiste pendant plusieurs années à -70°C (37).

3. Le liquide des cultures de tissus au contraire présente des caractères opposés que nous avons déjà signalés :

— Absence de pouvoir infectieux ;

— Absence ou faible pouvoir antigénique.

Le virus cultivé in vitro demeure intracellulaire. Il se montre par ailleurs extrêmement fragile dans ces conditions. Nous avons relaté au chapitre résultats les essais de conservation du virus dans différentes préparations et à différentes températures. On aboutit à la conclusion que le virus cultivé in vitro ne peut à aucun moment se libérer de la cellule et que seule une cellule intacte peut lui permettre de survivre à basse température.

II. INTERET DIAGNOSTIC DE LA POSSIBILITE DE CULTIVER SUR CELLULES DIPLOIDES HUMAINES LES VIRUS DU GROUPE VARIOLE-VACCINE.

Nous avons décrit au chapitre résultats les modifications entraînées par l'inoculation aux fibroblastes diploïdes humains de virus vaccinal. Nous avons pu vérifier ainsi les constatations déjà effectuées par d'autres auteurs (12, 32) et avoir un aperçu sur les possibilités offertes par ce nouveau système de culture cellulaire dans le diagnostic de la variole ou de la vaccine généralisée.

Dans les pays où la variole n'évolue pas sur le mode épidémique, le diagnostic de la maladie demeure difficile. Il s'agit, en effet, de cas sporadiques observés de surcroît par des médecins non familiarisés avec le tableau clinique de la variole. Dans cette éventualité le diagnostic est évoqué une fois l'épidémie déclenchée. Il y a donc intérêt à inciter la mise en œuvre systématique de recherches virologiques chez tout malade dont l'aspect clinique paraît suspect. Mais le diagnostic direct de la variole au Laboratoire est un problème qui est resté longtemps difficile. Tout récemment, Boue et Pournaki (2), ont proposé une conduite pratique de diagnostic direct faisant appel à des moyens que tout laboratoire de virologie clinique doit avoir à sa disposition. Pour ces auteurs, le diagnostic pratique comporte deux étapes successives :

- La première étape consiste à établir le diagnostic de groupe variole-vaccine.

Pour ce faire, le prélèvement pathologique est semencé sur des cultures cellulaires d'origine simienne ou d'origine humaine. L'observation des cultures est réalisée :

- en recherchant les foyers de dégénérescence cellulaire : ceux-ci apparaissent en 24 heures dans un tiers des cas, au bout de 48 heures, 95 % des prélèvements positifs provoquent la dégénérescence cellulaire ;

— en recherchant le phénomène d'hémadsorption à l'aide d'hématies de poulet : les cultures infectées par les virus du groupe vaccine-variole hémadsorbent les globules rouges de poulet. Si l'épreuve d'hémadsorption est négative au bout de 48 heures, l'éventualité de l'isolement d'un virus du groupe variole-vaccine doit être éliminée. Naturellement une culture témoin du virus de la vaccine permettra de vérifier que les globules rouges utilisés sont bien sensibles aux virus du groupe.

Les cellules diploïdes humaines peuvent être utilisées aux fins d'isolement des virus variole-vaccine. Les réponses sont plus rapides que celles fournies par l'inoculation de la membrane chorio-allantoïque de l'œuf embryonné. Il faut en effet attendre au moins trois jours pour voir apparaître les vésicules caractéristiques.

● La deuxième étape consiste à déterminer s'il s'agit du virus de la variole ou celui de la vaccine. Il sera procédé dans ce but à l'inoculation du matériel d'isolement :

— Au lapin par scarifications cutanées ;

— A des cultures de fibroblastes de poulet.

Chez le lapin, le virus de la variole ne produit qu'une simple réaction érythémateuse qui demeure toujours très discrète. Le virus de la vaccine en revanche donne lieu à une éruption papulopustuleuse caractéristique accompagnée d'une réaction inflammatoire toujours intense.

Les cultures de fibroblastes de poulet ne sont pas modifiées par le virus de la variole alors qu'elles sont détruites par le virus vaccinal.

Les cellules diploïdes humaines représentent donc un moyen d'isolement commode de ces deux virus dont la présence est décelée de façon précoce par l'épreuve d'hémadsorption.

III. INTERET DES CELLULES DIPLOIDES HUMAINES POUR LE DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE DU COM- MON COLD.

Hayflick et Moorhead ont insisté sur la réceptivité des souches diploïdes humaines aux divers agents du Common Cold (12). D'autres auteurs ont confirmé la valeur de ce système cellulaire pour l'isolement et la culture de ces virus dont les exigences sont bien connues. Cette propriété des cellules diploïdes humaines a été l'un des motifs qui ont incité le Laboratoire de Virologie de l'H.M.I. Desgennes à établir ses propres souches cellulaires.

L'étude de ces virus a connu un très grand développement au cours de ces dernières années. Les progrès réalisés dans leur connaissance ont été tels que le groupe international d'étude des Entérovirus a estimé possible la définition d'un sous-groupe spécial étroitement apparenté aux entérovirus mais distinct toutefois de ces derniers.

Il a été décidé au 8^e Congrès de Microbiologie de Montréal (avril 1962) de diviser le groupe des picarnovirus humains en trois sous-groupes (15).

Sous-groupe I : les entérovirus comprenant :

- les virus poliomyélitiques,
- les virus Coxsackie A,
- les virus Coxsackie B,
- les virus ECHO.

Sous-groupe 2 : les rhinovirus.

Sous-groupe 3 : certains virus non encore classés.

Hamparian (9) estime toutefois qu'il convient de ranger dans un même groupe, le groupe E.R.C., tous les agents du Common Cold. Ce groupe comprendrait ainsi les virus ECHO 28, les Rhinovirus et les Coryzavirus. Le groupe E.R.C. présente en effet des caractères biochimiques et sérologiques qui permettent son individualisation.

Sans doute s'agit-il, comme pour les entérovirus, de particules RNA de petite taille (15 à 30 m μ) résistants à l'éther. Mais contrairement aux entérovirus :

— le groupe E.R.C. résiste à un traitement de 30 minutes à 50°C. La perte du titre infectieux est de l'ordre de 1,8 log pour le groupe E.R.C. (comprenant le virus ECHO 28) alors qu'elle atteint 3,0 log pour les entérovirus.

— Le groupe E.R.C. se montre très sensible à pH 3,0. On doit noter que le virus ECHO 28 présente lui aussi cette particularité.

Il s'agit là pour Hamparian d'un caractère fondamental du groupe E.R.C. Sur le plan sérologique on dénombre actuellement, outre le virus ECHO 28 :

— 20 types sérologiques de Coryzavirus (17),

— 6 types sérologiques de Rhinovirus (30).

Rhinovirus et Coryzavirus n'ont aucune parenté antigénique avec les virus ECHO Coxsackie ou Réo.

Pendant longtemps l'isolement des virus du groupe E.R.C. n'était possible que sur primocultures de cellules rénales de fœtus humain cultivées à 33°C avec un milieu contenant de faibles concentrations de bicarbonate de soude (33). L'obligation d'utiliser ce seul système de cellules ralentissait considérablement la progression des connaissances sur ces virus :

— Il est difficile de disposer à chaque instant de rein de fœtus humains ;

— Il était connu par ailleurs que la sensibilité des cellules aux virus était variable selon les fœtus.

Les cellules diploïdes humaines allaient fournir un matériel de choix pour l'isolement et l'étude des virus du groupe E.R.C. Ces agents en effet y cultivent en produisant un effet cytopathogène surtout si l'on utilise des souches cellulaires dérivées de poumon ou de tissu rénal.

En ce qui concerne les Coryzavirus, Hamparian (17), rapporte les résultats d'une étude conduite avec des cel-

lules diploïdes humaines et qui a abouti à l'isolement dès le premier passage de 37 souches de Coryzavirus. L'auteur souligne l'intérêt d'utiliser les souches de cellules diploïdes pour l'isolement de ces virus mais note qu'il est préférable pour obtenir chez l'animal des sérums hyperimmuns, de faire appel à des cultures de virus adaptés sur cellules Hela et KB (10, 16). En ce qui concerne les Rhinovirus, il semble que toutes les souches de cellules diploïdes ne présentent pas la même sensibilité. Tyrell (21) rapporte les résultats de tentatives d'isolement de rhinovirus sur trois souches de cellules diploïdes. Il constate qu'une de ces souches se montre plus réceptive aux virus H.G.P. Toutefois le virus peut être adapté aux souches cellulaires qui se montrent résistantes lors des tentatives d'isolement. Des constatations analogues ont été faites avec le virus B 816.

L'auteur estime en conséquence qu'il convient, avant d'utiliser une souche de cellules diploïdes pour l'isolement des rhinovirus, d'apprécier sa sensibilité en la comparant avec d'autres souches cellulaires connues pour leur réceptivité à ces agents.

Les tentatives d'isolement de rhinovirus ayant abouti à des échecs, nos souches de cellules diploïdes humaines vont donc faire l'objet d'une étude préalable qui déterminera leurs possibilités dans ce domaine. C'est d'ailleurs en raison de ce fait que nous avons établi des souches à partir de quatre embryons différents.

CONCLUSIONS

La littérature insiste sur la sensibilité des cellules diploïdes humaines à de nombreux virus. Elle rapporte notamment les résultats suivants :

I. Les souches cellulaires du Wistar Institute de Philadelphie, établies par Hayflick et Moorhead permettent la cluture d'une gamme étendue de virus, en particulier celle de tous les myxovirus, des rhinovirus et de nombreux entérovirus. Le virus de l'hépatite infectieuse isolé sur cellules Détroit 6 pourrait également s'y multiplier.

II. Certaines souches établies au Laboratoire de l'H.M.I. Desgenettes se montrent sensibles aux ARBOvirus. Par ailleurs le virus du trachôme a pu être cultivé sur ces mêmes souches pendant trois passages en série avec production d'effet cytopathogène.

Notre travail concerne les résultats obtenus à l'occasion de tentatives d'isolement ou de culture de quelques virus sur les six souches de cellules diploïdes établies au Laboratoire de l'H.M.I. Desgenettes.

1. L'isolement des virus de la varicelle et de l'herpès a été facilement réalisé. Les lésions cytologiques présentent les mêmes caractères que ceux observés dans d'autres systèmes cellulaires. Les tentatives d'isolement d'adénovirus, de rhinovirus et du virus de l'hépatite infectieuse ont jusqu'ici abouti à des échecs.

2. L'adaptation des adénovirus aux cellules diploïdes humaines, isolés sur d'autres systèmes cellulaires, est possible. Toutefois les lésions nucléaires caractéristiques apparaissent lentement.

Deux souches de virus grippal (A et A2) isolées sur embryon de poulet, puis adaptées dans notre Laboratoire aux cellules épithéliales de rein de veau n'ont pu être cultivées sur aucune de nos souches de cellules diploïdes.

3. La souche de rhinovirus H.G.P. isolée sur rein de singe puis cultivée sur cellules diploïdes WI₂ et WI₃₈ se multiplie aisément sur toutes les souches de cellules diploïdes que nous avons utilisées.

Vu :

Le Doyen,

J. F. CIER.

Vu :

Le Président de la Thèse,

A. BERTOYE.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 11 Juin 1964.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. BLANK H., CORIELL L.-L., SCOTT T.-F.-M. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, 69, 341.
2. BOUE A., POURNAKI R. — Symposium international sur la vaccination antivariolique, Lyon, 7-8-9 décembre 1962.
3. COCHRANE G. — Technique de préparation des anticorps fluorescents. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, 99, 329.
4. COLETTE J. — Culture du virus grippal sur cellules épithéliales de rein de veau en couche monocellulaire. II. Etude du pouvoir cypathogène. *Thèse Lyon Méd.* 1961.
5. COONS A.-H., KAPLAN M.-H. — *J. exp. Med.*, 1950, 91, 1.
6. GIANNUZZI J. — Les cellules diploïdes humaines. Mise en culture. Entretien. Conservation. *Thèse Lyon Méd.*, 1964.
7. GOODPASTURE E.-W., ANDERSON K. — *Ann. J. path.* 1944, 20, 447.
8. HAMPARIAN V.-V., KETLER A., HILLEMANN M.-R. — *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1961, 108, 444.
9. HAMPARIAN V.-V., HILLEMANN M.-R., KETLER A. — *Proc. Soc. exp. Biol. Méd.*, 1963, 112, 1040.
10. HAMPARIAN V.-V. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 septembre 1963.
11. HANNOUN C. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 septembre 1963.
12. HAYFLICK L., MOORHEAD P.-S. — *Exp. Cell. Res.*, 1961, 25, 585.
13. HOYLE L., FAIRBROTHER R.-W. — *J. Hyg.*, 1937, 37, 512.
14. HOZINSKI V.-I., SEYBIL V.-B., CYPKIN L.-B., PANTEELEEVA N.-S., MAZUROVA C.-M. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 sept. 1963.

15. *International Enterovirus Study group, Picarnovirus group Virology*, 1963, 19, 114.
16. JOHNSON K.-M., ROSEN L. — *Ann. J. Hyg.*, 1963, 77, 15.
17. KETLER A., HAMPARIAN V.-V., HILLEMANN M.-R. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1962, 110, 821.
18. LASSALLE J. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 106 : 5, 752.
19. OSTERHOUT S., TAMM I. — *J. Immunol.*, 1959, 83, 442.
20. OUTCHERLONY O. — *Ark F. Kemi. Mineral Geol.*, 1949, 26, 1.
21. PAMELA K., TYRRELL D.A.J. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 sept. 1963.
22. PASCHEN E. — *Zool. Bakt.* (1 Abt ; orig), 1933, 130, 190.
23. QUAGLINO B. — Culture du virus grippal sur cellules épithéliales de rein de veau en couche monocellulaire. I. Adaptation de la souche APR8. *Thèse Lyon Méd.* 1961.
24. RIVERS T.-M. — *J. Exp. Méd.*, 1926, 43, 275.
25. ROSANOFF E.-I. — *Symposium Opatija*, 24-26 sept. 1963.
26. ROSANOFF E.-I., HEGARTY C.-P. — *Virology*, 1964, 22, 284.
27. SLOTNICK V.-B., ROSANOFF E.-I. — *Virology*, 1963, 19, 589.
28. SOHIER R., PEILLARD M.-M., GINESTE J., FREYDIER J. — *Ann. Biol. Clin.*, 1956, 3-4, 281.
29. TAYLOR A.-R., RIGHTSEL W.-A., BOGGS J.-D., Mc LEAN I.-W. — *Am. J. Med.*, 1962, 32-5, 679.
30. TAYLOR A.-R., ROBINSON D., TYRRELL D.A.J. — *Lancet*, 1962, 1, 452.
31. TOURNIER P., CATHALA F., BERNHARD W. — *Presse Méd.* 1957, 65, 1230.
32. TRLIFAJOVA J., STRIZOZOVA V., STASTNY F. — *Symposium Opatija*, 24-26 sept. 1963.
33. TYRRELL D.A.J., PARSONS R. — *Lancet*, 1960, 1, 239.

34. VOGEL J., SHELOKOV. — *Science*, 1957, 126, 358.
35. WELLER Th., STODDARD M.-B. — *J. Immunol.*, 1952, 68, 311.
36. WELLER Th. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1953, 83, 340.
37. WELLER Th., WITTON H.-M., BELL E.-J. — *J. Exp. Méd.* 1958, 108, 843.
38. YOUNGER J.-S. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1954, 84, 570.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
PREMIERE PARTIE. — Données fournies par la Littérature	15
CHAPITRE PREMIER. — Les cellules diploïdes humaines	17
CHAPITRE II. — Sensibilité des cellules diploïdes humaines aux virus	23
DEUXIEME PARTIE. — Travail personnel	29
CHAPITRE PREMIER. — Matériels et techniques	31
I. Tentatives d'isolement des virus sur cellules diploïdes humaines	31
II. Tentatives d'adaptation sur cellules diploïdes humaines de virus de collection	41
III. Cultures de virus déjà adaptés aux cellules diploïdes humaines	42
CHAPITRE II. — Résultats	58
CHAPITRE III. — Discussion	58
CONCLUSIONS	72
BIBLIOGRAPHIE	74

